Tres décadas del saneamiento de cultivares de cítricos en Cuba

Victoria Zamora, María González, Inés Peña Bárzaga y Juana María Pérez Castro

Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Ave 7[ma], No 3005, e/ 30 y 32, Miramar, Playa, La Habana, Cuba.
Email: victoriazamora@iift.cu

RESUMEN

La técnica de microinjerto *in vitro* de ápices caulinares en el cultivo de los cítricos, se desarrolló como consecuencia de las dificultades que presentaban las otras formas de saneamiento para la obtención de plantas libres de enfermedades transmisibles por injerto. En Cuba se comenzaron los primeros ensayos para el establecimiento de la técnica en 1973 y en 1977 se informaron los primeros resultados y los cultivares saneados. En este trabajo se describe el desarrollo de este procedimiento y su aplicación en el programa de producción de material de propagación certificado de cítricos, durante tres décadas. En el período de estandarización se incrementó el número de injertos exitosos mediante la realización de un corte lateral en la plántula patrón para la implantación del ápice a injertar. Otro resultado importante fue la introducción del reinjerto de las plantas microinjertadas, en patrones vigorosos cultivados en macetas. Esto permitió acelerar el desarrollo vegetativo de las plantas para la certificación de su estado sanitario, el que se realiza mediante pruebas biológicas, análisis electroforéticos, técnicas inmunoenzimáticas y métodos moleculares. La aplicación de esta técnica en los Programas de saneamiento y de Cuarentena en Cuba, ha permitido la recuperación de los recursos fitogenéticos nacionales y la introducción de especies y variedades de interés comercial. Debido a este trabajo, la colección del material saneado del país cuenta con 149 accesiones, disponibles en el Banco de Germoplasma Protegido, como base para el Sistema de Producción de Material de Propagación Certificado de Cítricos.

Palabras clave: microinjerto *in vitro*, saneamiento, cítricos, certificación

ABSTRACT

The shoot tip grafting *in vitro* technique was developed as a consequence of the difficulties that presented the other forms of sanitation to obtain plants free of graft transmissible diseases in the citrus crop. The first experiments for the establishment of this technique started in Cuba in 1973 and the first results obtaining healthy cultivars were reported in 1977. The development of this procedure and its application in the production program of citrus certified propagation material during three decades are described in this paper. During the standarization period the number of successful grafts was increased by means of a lateral cut in the rootstock plantlet for the implantation of the shoot tip to be grafted. Another important result was the introduction of the regrafting of the micrografted plants in vigorous rootstocks cultured in pots. This has permitted to accelerate the vegetative development for the certification of its sanitary status which is carried out with biological tests, electophoretic analysis, immunoenzymatic techniques and molecular methods. The application of this technique in sanitation and quarantine programs in Cuba has allowed the recovering of the national phytogenetic resources and the introduction of species and varieties of commercial interest. Due to this work, the collection of healthy plants in the country counts with 149 accessions, available at the Protected Germplasm Bank, as the basis for the Production System of Citrus Certified Budwood.

Key words: shoot tip grafting *in vitro,* sanitation, citrus, certification

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades causadas por virus, viroides, bacterias y fitoplasmas, presentes en las plantas de cítricos ocasionan importantes pérdidas económicas. Estos patógenos influyen de forma determinante en la producción y vigor de las plantas, calidad de las frutas, limitan el uso de varios patrones y pueden ocasionar la muerte de las mismas. Para su control es imprescindible utilizar material de propagación certificado genética y sanitariamente, que garantice árboles de alto potencial productivo, disminuir los daños y lograr plantaciones con elevada producción y de buena calidad.

Desde finales de la década del 60, se iniciaron los trabajos en Cuba, con vistas a mejorar el material de propagación de los cultivares en producción. En este período se realizó la introducción de cultivares certificados desde California en 1969 y se estableció la Estación de Virología de los Agrios, posteriormente llamada Estación Nacional de Sanidad de Cítricos (ENSAC). Los objetivos principales de esta estación fueron el desarrollo de métodos de diagnóstico, la determinación de las enfermedades presentes en las plantaciones, la selección de plantas libres de enfermedades de tipo viral y el establecimiento de los métodos de obtención de plantas sanas.

La técnica de microinjerto *in vitro* de ápices caulinares (MIV) surgió como consecuencia de las dificultades e inconvenientes que presentaban otros métodos de obtención de plantas libres de enfermedades transmisibles por injertos en los cítricos, tales como la selección y análisis de viejos clones existentes, la termoterapia, la selección de progenies nucelares o el cultivo de nucelos, óvulos y ápices *in vitro.* Esta técnica, fue descrita por primera vez en 1972 por Murashige *et al.* y por Bitters *et al.* Más tarde, Navarro *et al.* (1975), publicaron los resultados de amplios estudios en que evalua-

ron diferentes variables y establecieron las condiciones óptimas para su realización.

Hasta el momento, es la técnica más efectiva, desde el punto de vista sanitario, para la eliminación de todos los patógenos transmisibles por injerto en cítricos, incluyendo aquellos que no son eliminados por termoterapia. Desde el punto de vista agrotécnico las plantas obtenidas conservan las características genotípicas de las plantas madres y no presentan los caracteres juveniles que aparecen en las plantas producidas por semillas (Navarro y Juárez, 1977 y Navarro, 1993).

En Cuba comenzaron las investigaciones para el establecimiento de la técnica de microinjerto en 1973 en la ENSAC. Los primeros cultivares sanos se certificaron en 1976 y los resultados de las primeras investigaciones fueron publicados en 1977 por González *et al*., (1977a, 1977b). A partir de ese momento, se continuo de manera ininterrumpida la optimización y la aplicación de esta técnica en los programas de producción de material de propagación certificado de cítricos en el país y en otras investigaciones.

El objetivo de este trabajo es hacer un recuento de los aspectos más importantes de esta trayectoria, los resultados alcanzados y su aplicación en los programas sanitario y de cuarentena, para la producción de material de propagación certificado, que garantice la sostenibilidad de la industria citrícola del país.

ESTABLECIMIENTO DE LA TÉCNICA DE MIV

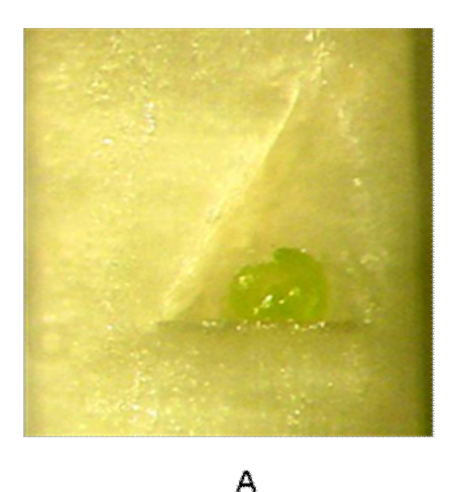
Los trabajos iniciales para el establecimiento de la técnica de MIV permitieron definir aspectos fundamentales para la realización exitosa de la misma.

Tipos de cortes del microinjerto. Se evaluaron tres tipos de cortes en el patrón para la implantación de los ápices: sobre el epicotilo decapitado y laterales en forma de muesca o de ventana triangular. Este aspecto fue el de mayor influencia sobre el prendimiento y desarrollo de los microinjertos. De los tipos de corte evaluados, los mejores resultados se lograron con los de tipo lateral y se escogió una ventana triangular a 2mm aproximadamente del extremo del epicotilo decapitado del patrón (González *et al.,* 1977b), la que por sus buenos resultados se continúan utilizando hasta el presente (Fig.1).

Fuentes de brotes y tamaño del ápice. Se evaluó el efecto de las fuentes de brotes a partir de cultivares infectados artificialmente, material procedente de árboles de campo o de reproducciones de ellos cultivadas en macetas. De estas plantas, se colectaron los brotes de hasta 3cm de longitud, que constituyeron las fuentes de los ápices que se insertaron con tamaños de 0.2-0.5mm. La procedencia de los brotes para obtener los ápices no incidió en la frecuencia de microinjertos exitosos, como tampoco influyó el tamaño del ápice implantado, sin embargo este factor si incidió en el saneamiento de las plantas obtenidas. Para garantizar el estado sanitario de las mismas se estableció un tamaño de ápices entre 0,1-0,2mm, lo que permite resultados satisfactorios en el prendimiento y en el saneamiento (González *et al.,* 1977b).

Patrones. En este aspecto se estudió el efecto de diferentes especies utilizadas como patrones, las condiciones de cultivo y la edad óptima de estos para realizar los microinjertos.

En los trabajos iniciales solamente se utilizaron patrones trifoliados (González *et al*., 1977a, 1977b) y poste-



A



B

Fig. 1. Microinjerto *in vitro*. Corte lateral en forma de ventana triangular con el ápice implantado (**A**) y ápice en crecimiento (**B**).

riormente para el saneamiento del cultivar de limonero L-1 (*Citrus limon* (L.) Burm.) (González *et al*., 1980a) se utilizaron además del citrange Troyer (*Citrus sinensis* (L.) Osb.x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) plántulas de naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.) y *Citrus macrophylla* Wester. El prendimiento efectivo (con crecimiento) obtenido fue de 17,5% para el agrio y el citrange Troyer, mientras que ascendió a 45% con *C. macrophylla*. Cuando se utilizó este mismo patrón para el saneamiento de lima Persa (*Citrus latifolia* Tan.) el promedio de prendimiento alcanzó el 70% (González y Peña, 1981).

Posteriormente se evaluaron el *Poncirus trifoliata* y algunos de sus híbridos como los citrumelos Swingle, y 1452 (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.), el Citrandarin (*Citrus reticulata* Blanco x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) y el citrange Troyer, en el saneamiento de naranja dulce Madame Vinous y mandarina Parson's Special (Fig. 2). Se observaron diferencias en el período en que las plantas estaban aptas para el microinjerto a partir de la fecha de siembra de las semillas y en el porcentaje de microinjertos exitosos. Las plantas de Citrandarin estaban aptas a los 9 días, las de citrumelo Swingle entre los 9-12 y las restantes a los 12 días. Aunque con todos los patrones se obtuvieron plantas microinjertadas, el Citrandarin y el Citrumelo Swingle fueron los más favorables (Zamora *et al*., 1995).

En general la edad óptima de los patrones etiolados para realizar los microinjertos, comprende de 9 a 14 días en dependencia del vigor de la especie que se utilice.

Medios de cultivoe influencia de cotiledones en el desarrollo de los microinjertos. Para favorecer el prendimiento de los MIV y su desarrollo posterior, se compararon los medios de cultivo de MS (Murashige y Skoog, 1962) y el de Hoagland con modificaciones (Hartman y Kester, 1964), tanto en la obtención de los patrones como en la calidad de las plantas microinjertadas (González *et al*., 1977b; 1980a). Este ensayo se cumplimentó con la adición de sacarosa en concentraciones de 30- 40- 50g/l para el cultivo *in vitro* de los patrones y de 50- 75g/l para las plantas microinjertadas, así como la supresión o no de los cotiledones en los patrones al momento de ser microinjertados. Se comprobó la superioridad del medio MS sobre el de Hoagland para el cultivo de las plantas obtenidas por MIV (Murashige *et al*., 1972; Navarro *et al*., 1975; González *et al*., 1977b; 1980a). Se observó una relación inversa entre el prendimiento efectivo y la concentración de sacarosa en el medio de siembra, ya que los mejores resultados se obtuvieron con la adición de 30g/l. Para las plantas microinjertadas las dos concentraciones utilizadas fueron favorables (González *et al*., 1980b). Las plantas microinjertadas crecieron adecuadamente cuando se sembraron y cultivaron en el medio de MS, lo que indica que el mismo posee un nivel de nutrientes que compensa la ausencia de cotiledones en esta etapa de desarrollo de las plantas (González *et al*., 1980a) (Fig. 3).

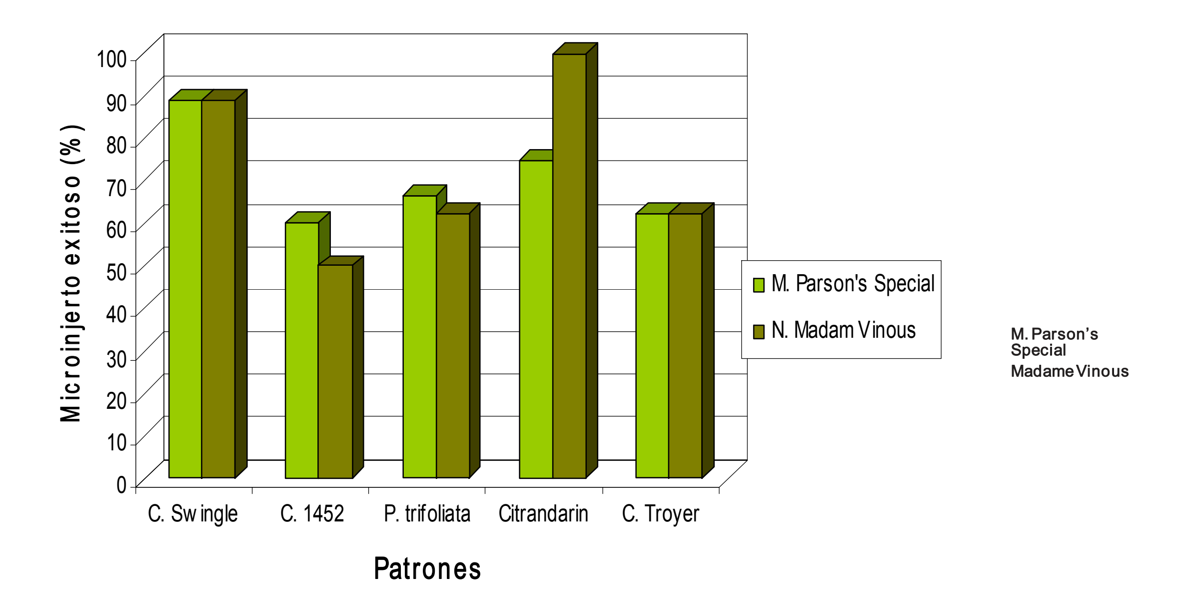
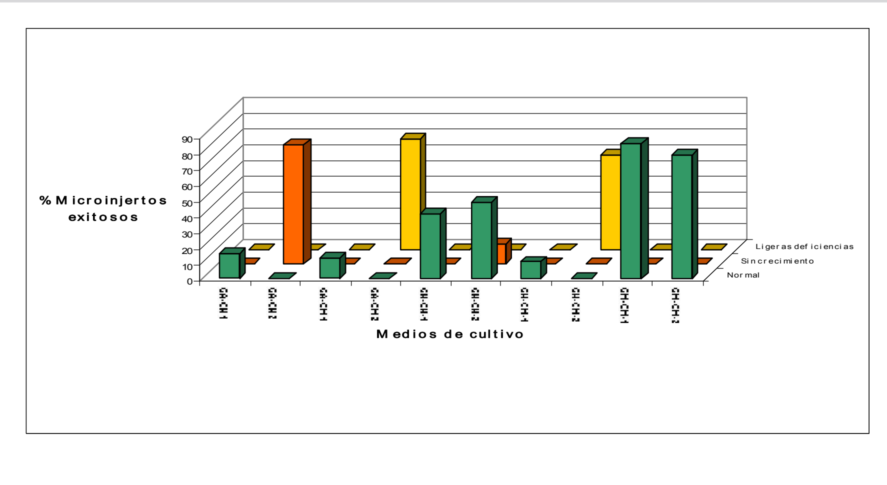


Fig. 2. Porcentaje de microinjertos *in vitro* exitosos de mandarina Parson's Special y naranja Madam Vinous con diferentes patrones trifoliados.



G=cultivo patrones
C=cultivo plantas MIV
H=medio Hoagland
M=medio Murashige y Skoog
A=medio agar
1=patrones con cotiledones
2=patrones sin cotiledones

Fig. 3. Influencia de los medios de siembra de patrones y de cultivo de plantas microinjertadas y de la presencia o no de cotiledones en el porcentaje de microinjertos exitosos y el desarrollo de las plantas.

Tiempo de permanencia *in vitro* y del trasplante a tierra. Se realizaron ensayos para determinar el período de permanencia *in vitro* de las plantas microinjertadas. Los resultados mostraron que en los períodos de cultivo de 90-150 días el porciento de supervivencia de las plantas fue de 61%, mientras que cuando este se redujo entre 30 -60 días, la supervivencia fue de 92%.

Fueron evaluados períodos entre 2 y 8 semanas, para la adaptación de las plantas microinjertadas a las condiciones ambientales de cultivo, alcanzándose en general un 90% de supervivencia en todos los casos, por lo que adoptó el tiempo de 2 semanas como el más adecuado (González *et al*., 1977a; 19977b; 1980b).

A finales de 1974 se logró la supervivencia al trasplante a tierra de las primeras plantas obtenidas por esta técnica en nuestro país, (González *et al*., 1977a; 1977b). Los resultados establecidos hasta ese momento permitieron obtener plantas de varios cultivares que portaban originalmente diferentes enfermedades de tipo viral y de las cuales resultaron liberadas como se comprobó posteriormente, mediante los diagnósticos biológicos efectuados a las mismas (Pérez *et al*., 1980; Matos *et al*., 1981; Pérez y Matos, 1982).

Esta etapa de establecimiento de la técnica de MIV, permitió de forma paralela obtener plantas saneadas a partir de material infectado. La exocortis se eliminó en el 89,5 %, la xiloporosis en el 74 % y la psorosis se eliminó de una sola planta obtenida por MIV a partir de una portadora inoculada. La tristeza no fue detectada en ninguna de las plantas originales (González *et al*., 1977b; 1980a; 1980b; 1983; Matos *et al*., 1981; Peña *et al*., 1983). La única enfermedad transmisible por injerto no eliminada con esta técnica fue el denominado «virus parecido al crinkly leaf »(v.p.c.l.), detectado en nuestro país (Pérez *et al*., 1977). No obstante la combinación de la termoterapia con el MIV permitió obtener resultados satisfactorios en la eliminación de esta patología. (Peña *et al.,* 1982).

DESARROLLO Y APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE MIV

En la década del 80 se continuó trabajando en el perfeccionamiento del MIV para su aplicación en el programa de saneamiento de cultivares nacionales y el programa de cuarentena para la diversificación de los cultivares del país.

Las plantas obtenidas por MIV durante los meses posteriores al trasplante a tierra poseen un lento desarrollo, lo que ocasiona retraso para realizar los análisis de diagnóstico y comprobar su estado sanitario. Para reducir esta etapa se probó la variante propuesta por De Lange (1978), consistente en el reinjerto de dichas plantas en patrones vigorosos de 6 u 8 meses. El ensayo se realizó en el proceso de saneamiento de 22 selecciones de pomelos Marsh, Ruby y Thompson (*Citrus paradisi* Macf.), procedentes de la Isla de la Juventud. La supervivencia con el reinjerto fue de 67%, algo menor que la obtenida con el trasplante tradicional (84%). Sin embargo, esta diferencia se compensó con la mayor velocidad de crecimiento, la calidad y cantidad del material de propagación que se puede obtener en pocos meses. Las plantas reinjertadas estuvieron listas para propagar y certificar seis meses antes que con el trasplante en nuestras condiciones (González *et al.*1989). Actualmente la supervivencia de los reinjertos alcanza más del 95% de las plantas, resultados similares a los obtenidos por Navarro *et al.* (2002) (Fig. 4).

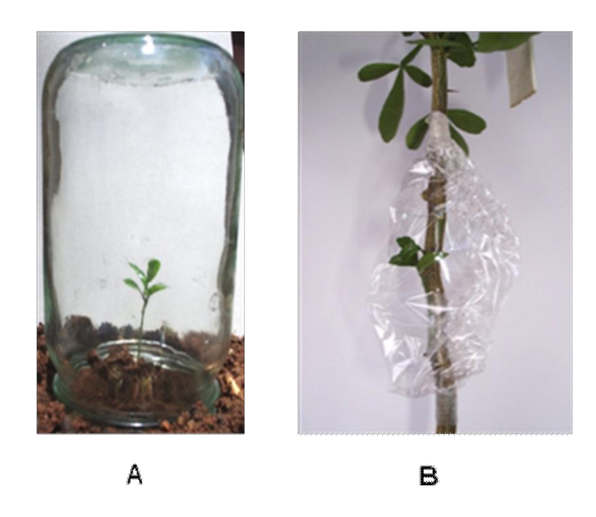


Fig. 4. Variantes del paso a condiciones ambientales de las plantas microinjertadas. **(A)** Trasplante directo **(B)** Reinjerto

Se evaluó el cultivo *in vitro* de varetas para fuentes de ápices, de acuerdo a la metodología de Navarro *et al*. (1984), como una alternativa segura para la introducción de germoplasma foráneo. Con este procedimiento se reducen los riesgos de introducir al país patógenos que pueden estar presentes en el material importado (González y Vigaud 1987; González, 1987; 1990b). Otros aspectos de este procedimiento fueron evaluados en nuestro país por Mas *et al.,* (1989; 1991). Las introducciones de nuevas especies y variedades cítricas se han realizado desde Francia, Estados Unidos (California y Florida), Jamaica y Viet Nam, pero en mayor cuantía proceden de las colecciones de España (Zamora *et al*., 1995b; 1997; 2005).

En 1987 se procedió al saneamiento de 18 cultivares incluidos en el Programa de Mejoramiento, para la producción de material de propagación certificado de cítricos (UNECIT, 1987). Estos cultivares incluyeron 3 pomelos, 8 naranjas dulces, 4 mandarinas e híbridos, 2 limas ácidas y un limón, cuyo proceso de saneamiento concluyó en 1990 (González *et al*., 1990a y Pérez *et al*., 1989).

En el 2006 Zamora *et al*. revisaron y actualizaron una metodología detallada sobre la técnica de microinjerto, que recogía la experiencia acumulada en el desarrollo de estos trabajos a partir de una preliminar elaborada en 1990, por González *et al*. (1990b).

Con la detección en Cuba del *Virus de la tristeza de los cítricos* y el *Toxoptera citricida* Kirk. en 1993 se inició un fuerte trabajo de perfeccionamiento del Sistema de Producción de Material de Propagación Certificado de Cítricos (Fig. 5), incluyendo la elaboración del documento rector (IIFT, 1996), en el que la técnica de MIV constituye la base fundamental. Cada componente del Sistema tales como el Banco de Germoplasma Protegido de los cultivares saneados, el Bloque de Fundación con las

PROGRAMA DE CERTIFICACIÓN

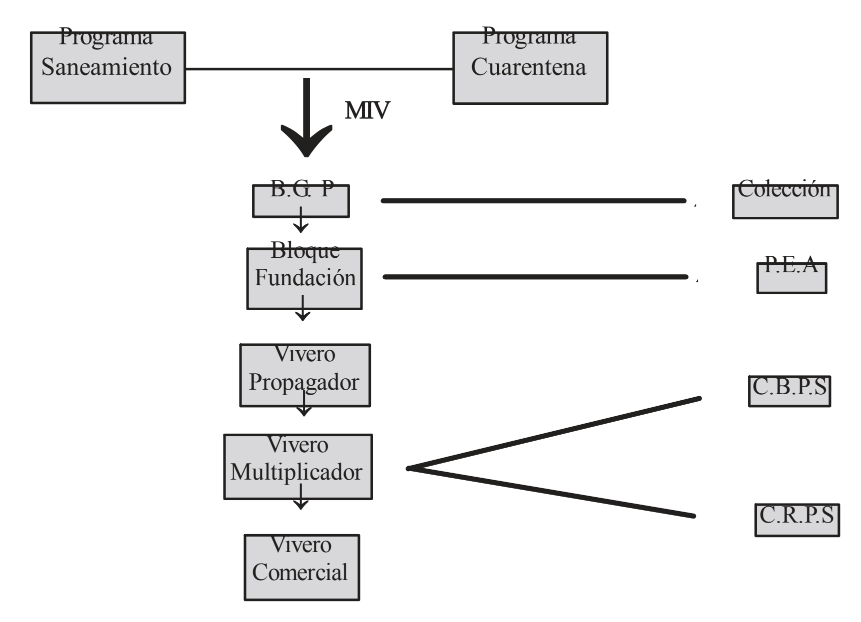


Fig. 5. Esquema del Sistema de Producción de Material de Propagación Certificado de Cítricos en Cuba. **B.G.P**: Banco de Germoplasma Protegido. **P.E.A**: Parcela de Evaluación Agronómica. **C.B.P.S**: Campo Básico de Producción de Semillas. **C.R.P.S**: Campo Registrado de Producción de Semillas.

variedades comerciales fundamentales, el Vivero Propagador y el Vivero Multiplicador, fueron establecidos en aisladores de malla antiáfidos, en la Unidad Científico Tecnológica de Base de Alquízar de la provincia de La Habana. Como medida preventiva ante una posible infección por CTV, las variedades comerciales utilizadas en el país, fueron procesadas mediante la técnica de MIV y certificadas nuevamente.

Las yemas certificadas producidas en este sistema, se emplean para establecer los 6 viveros Multiplicadores protegidos en las principales Empresas del país: Victoria de Girón en Jagüey Grande y Ceballos en Ciego de Avila, con una producción anual aproximada de 300 000 yemas; Ceiba del Agua alrededor de 100 000; Contramaestre 50 000, Banes 40 000 e Isla de la Juventud 20-25 000. Para fortalecer la protección del material de siembra, los viveros comerciales de las Empresas de Jagüey Grande, Ceiba del Agua y Contramaestre, se establecieron en instalaciones cubiertas con tela antiáfidos.

El excedente de yemas producidas en los viveros de Alquízar, Isla de la Juventud y Ceiba, se ha exportado según solicitudes de algunos países de la región del Caribe como México, Haití, República Dominicana y Guatemala, los que han adquirido más de un millón de yemas en los últimos años, especialmente de los cultivares lima Persa, naranjas Valencia, Hamlin y China, pomelos blancos y pigmentados, mandarinas Dancy y Satsuma. Por otra parte las semillas certificadas también se han exportado con un monto de más de 2 600Kg de los patrones *Citrus macrophylla*, *Citrus volkameriana* y mandarina Cleopatra (*Citrus rehsni* Hort. ex Tan.) a España, México y Haití (Lecha *et al*., 2006).

Los esfuerzos realizados tanto en el perfeccionamiento de la técnica de MIV, como en la destreza del personal y en el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico de las enfermedades trasmisibles por injerto, han contribuido a que los resultados hayan ido en ascenso en cuanto al logro de microinjertos exitosos (Tabla I), a la disminución del tiempo para obtener una planta certificada desde 30 meses en la primera etapa, 23-24 meses cuando se aplicó el reinjerto hasta 14-16 meses actualmente coincidiendo con Navarro *et al.* (2002). Este período puede prolongarse unos 6 meses más si la certificación de cachexia se realiza por ensayos biológicos con la mandarina Parson's Special (Pérez *et al.,* 2002, 2007), así como por la eficiencia del saneamiento que se incrementó de 90,4% en la etapa de establecimiento a 99,6% en la etapa actual.

La experiencia cubana con esta técnica ha permitido la difusión de los conocimientos a especialistas de diferentes países del área. Se han brindado asesorías o entrenamientos a especialistas nacionales y de México, Honduras, República Dominicana, Viet Nam y Dominica. Especialmente importante ha sido el trabajo desarrollado en cuanto a entrenamiento de personal, el establecimiento de un programa de producción de material de propagación certificado y el saneamiento de cultivares nacionales y foráneos desarrollado en Veracruz, México, con la Empresa PROCIGO. Otras formas de transmisión de los conocimientos han sido por medio de, conferencias y clases prácticas en cursos de Citricultura, Maestrías, cursos a productores y viveristas, así como a estudiantes del ISCAH y la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana.

Tabla I

Porcentaje de microinjertos exitosos de un grupo de accesiones saneadas a partir de la década del 90.

Grupos	Número de accesiones	% prendimiento (presos/total)	% crecimiento (del total)
Pomelos	23	67.99	40.27
Naranjas	39	67.41	48.74
Mandarinas	18	67.41	51.79
Limas	3	71.91	42.7
Limones	2	80.95	57.14
Cidras	2	68.57	9.52
Patrones	14	76.09	67.39
Otros	1	80	70

Otro resultado de la aplicación de la técnica de MIV, fue la separación de patógenos en infecciones mixtas presentes en el material original. El denominado v.p.c.I. y líneas o componentes de este complejo, fueron separadas de la infección por viroides de las fuentes originales (González *et al*., 1977b y Pérez *et al*., 1981). En 1995 Pérez *et al*. corroboraron esta posibilidad, al lograr la separación de los viroides de la exocortis y la caquexia en plantas microinjertadas de mandarina Parson's Special.

Es necesario destacar la aplicación de esta técnica en investigaciones con frutales no cítricos como la guayaba y el aguacate (Fariñas *et al*. 1992, 1993). El dominio de la técnica en sus diferentes fases, permite aplicarla para el saneamiento de otras especies de frutales como melocotón, albaricoque, ciruelo, pistacho, manzana, uva, fresa y maracuyá, entre otras (Navarro 1988; De Almeida Lima y Pinto da Cunha, 2004; Biricolti y Chiari, 1994),

Teniendo en cuenta todos estos años de trabajo es de destacar que el esfuerzo realizado ha permitido que Cuba se encuentre entre los países productores de cítricos que cuentan con un Sistema de Producción de Material de Propagación Certificado tales como España, Estados Unidos, Brasil, Argentina y Sudáfrica entre otros. Este Sistema está establecido con las técnicas adecuadas y el personal calificado necesarios para su funcionamiento y garantiza todo el material de propagación que se utiliza en el país. Ha permitido además que se disponga de una colección de cultivares y patrones de cítricos y géneros afines de 149 accesiones (Anexo 1), certificada como libre de enfermedades transmisibles por injertos y ubicada en el Banco de Germoplasma Protegido (Zamora *et al*., 2005), La compleja situación fitosanitaria de las Américas implica la impostergable implementación de los sistemas de certificación del material de propagación, en los cuales Cuba tiene una amplia experiencia de trabajo y puede brindar apoyo a otros países, como se ha ido efectuando hasta la fecha.

BIBLIOGRÁFÍA

Biricolti, S. and A. Chiari. 1994. Meristem culture and micrografting of *Passiflora edulis* f. *edulis*. *Adv.Hort. Sci*.,8 (3): 171-175.

Bitters, W.P.; T. Murashige; T.S. Rangan; E. Nauer; C.N. Roistacher and P.B. Holliday. 1972. Healthy trees from the test tubes. *Citrograph* 85,86,105.

De Almeida Lima, A. and M.A. Pinto da Cunha. 2004. Maracujá: Produção e Qualidade na Passicultura. EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Brasil. 396 p.

De Lange, J.H. 1978. Shoot-tip grafting. A modified procedure. *The Citrus and Subtropical Fruit Journal*: 13-15, Oct.

Fariñas, M. E.; M. González; V. Zamora; F. Vigaud y T. Rodríguez. 1992. Primeros resultados en el microinjerto *in vitro* de *Psidium guajava* L. III Taller de Fisiopatología Vegetal. INIFAT. Cuba.

Fariñas, M. E.; M. González; V. Zamora; F. Vigaud y T. Rodríguez. 1993. Primeros resultados en el microinjerto *in vitro* de *Persea americana* Mill. 3er Coloquio Intern. de Biotecnología de las Plantas, Villa Clara. Cuba.

González, M.; I. Peña; J. González; I. Rodríguez y V. Zamora. 1977a. Eliminación del viroide de la exocortis en plantas de tangelo Ugly por injerto *in vitro* de ápices de brotes. V Reunión Nacional de Invest. de Cítricos y otros Frutales. Tomo II: 29-36. Jagüey Grande, Matanzas. Cuba.

González, M.; I. Peña; J. González; V. Zamora e I. Rodríguez. 1977b. Introducción en Cuba del injerto *in vitro* de ápices de brotes en el género *Citrus* y géneros afines, como una forma de obtener plantas libres de virus. *Agrotecnia de Cuba* 9(2): 61-71.

González, M.; I. Peña e I. Rodríguez. 1980a. Influencia de patrones y medios nutritivos sobre el prendimiento y desarrollo *in vitro* de injerto de ápices para la obtención de plantas libres del viroide de la exocortis a partir de un clon de *Citrus limon* infestado. *Agrotecnia de Cuba* 12 (6): 67-76.

González, M.; J. González; I. Peña V. Zamora e I. Rodríguez. 1980b. La técnica de microinjerto *in vitro* como método de obtención de plantas libres de virus y/o afines en el género *Citrus*. Su introducción y desarrollo en nuestro país. Informe del quinquenio 76-80. Tema 09, 72p.

González, M. e I. Peña. 1981. Influencia de los cotiledones sobre el prendimiento y desarrollo de microinjertos *in vitro*. Memorias I Congreso Nacional de Cítricos y otros Frutales. Tomo I: 241-256. Palacio de las Convenciones, Ciudad de La Habana. Cuba.

González, M.; I. Peña y J.M. Pérez. 1983. Obtención de plantas de toronja «Ruby» *C. paradisi* Macf. liberadas de exocortis por microinjertación *in vitro*. *Cienc. Tec. Agric. Cítricos y otros Frutales* 6 (4): 125-130.

González, M. y F. Vigaud. 1987a. Algunos aspectos del cultivo *in vitro* de vástagos de cítricos y su aplicación a un sistema de cuarentena. II Jornada Científico Técnica de Sanidad Vegetal. Ciudad de La Habana. Cuba.

González, M. 1987b Importancia de la técnica de microinjerto *in vitro* en un programa de saneamiento y un sistema de cuarentena para cítricos. *Ciencia y Técnica en la Agric. Cítricos y otros Frutales* 10 (2): 37- 45.

González, M.; V. Zamora; F. Vigaud y T. Rodríguez. 1989. Reducción del tiempo de saneamiento de cultivares de cítricos mediante el reinjerto *in vivo* de las plantas obtenidas por microinjerto *in vitro*. Simposio XX Aniversario de la ENSAC. Ciudad de La Habana. Cuba.

González, M.; I. Peña; J. González; V. Zamora; I. Rodríguez; F. Vigaud y T. Rodríguez. 1990a. Establecimiento, desarrollo y aplicación de la técnica de microinjerto *in vitro* en Cuba. II Seminario Internacional de Sanidad Vegetal. Cuba.

González, M.; I. Peña; J. González; V. Zamora y F. Vigaud. 1990b. Metodología para la técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro* y su utilización en el programa de saneamiento y en un sistema de cuarentena para cítricos. IICF. Cuba.

Hartman, H.T. y E. Kester. 1964. Propagación de plantas: principios y prácticas. México. Editorial Continental S.A. 814 p.

IIFT. Cuba. 1996. Sistema para la Producción de Material de Propagación Certificado de Cítricos.

Lecha, L.; M. González; V. Barrios; F. Pérez; F. Guerra; M. Wong; J.F. Guerra. 2006. Impacto económico de las exportaciones de material de propagación certificado como aporte al financiamiento en MLC a las investigaciones frutícolas. XVI Forum de Ciencia y Técnica. Ciudad de la Habana, Cuba

Mas, O; A. Campos y A. Rios. 1989. Esterilización de varetas de cítricos para su cultivo *in vitro*. Simposio XX Aniversario de la ENSAC. Ciudad de La Habana, Cuba.

Mas, O.; A. Ríos; B. Morales; M. Mirabal; A. Campos y M. González. 1991. Metodología para la introducción de material de propagación vegetativo de cítricos a traves de cultivos *in vitro*. Comunicación breve. *Centro Agrícola* 18 (3):75-78.

Matos, N.; De Bernard, A.; J.M. Pérez y M. González. 1981. Estudio de las enfermedades virales y afines de los cítricos en Cuba, problemática y perspectivas futuras. Memorias I Congreso Nacional de Cítricos y otros Frutales. Palacio de las Convenciones. Ciudad de La Habana, Cuba. Tomo II: 265-281.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15: 473-497.

Murashige, T.; W.P. Bitters; E.M. Rangan; E.M. Nauer; C.N. Roistacher and P.B. Holliday. 1972. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free *Citrus* clones. *Hort Science* 7: 118-119.

Navarro, L.; C.N. Roistacher and T. Murashige. 1975. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free Citrus. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci*. 100: 471-479.

Navarro, L. and J.Juárez. 1977. Elimination of citrus pathogens in propagative budwood II: In vitro propagation. Proc. Int. Soc. Citriculture 3: 973-981.

Navarro, L.; J. Juárez; J.A. Pina y J.F. Ballester. 1984. The citrus quarantine station in Spain. Proc. 9th Conf. IOCV. 365-370. Riverside, California.

Navarro, L. 1988. Application of Shoot-tip Grafting *in Vitro* to Woody Species. *Acta Horticulturae* 227: 43-55.

Navarro, L. 1993. Citrus Sanitation, Quarantine and Certification Programs. In: Proc. 12th Conf. IOCV. 383-391. IOCV, Riverside, California.

Navarro, L.; J.A. Pina; J. Juárez; J.F. Ballester-Olmos; J.M. Arregui, C. Ortega, A. Navarro; N. Duran-Vila, J. Guerra; P. Moreno; M. Cambra; A. Medina and S. Zaragoza. 2002. The Citrus Variety Improvement Program in Spain in the Period 1975-2001. In; Proc. 15th Conf. IOCV. 306-315. IOCV, Riverside, California.

Peña, I.; M. González; N. Matos y F. Doval. 1982. Efecto del calor ante el virus parecido al crinkly leaf de los cítricos. II Jornada Cientifico Técnica del Inst. Invest. Agric. «Jorge Dimitrov». Bayamo, Cuba.

Peña, I.; M. González y J.M. Pérez. 1983. Eliminación de la exocortis en un clon de toronja rosada «Thompson» *C. paradisi* Macf. mediante el microinjerto *in vitro*. *Cienc. Tec. Agric. Cítricos y otros Frutales* 6 (2): 149-152.

Pérez, J.M.; A. De Bernard. y C.B. Moya. 1977. Una virosis que afecta a los cítricos: su semejanza con el crinkly leaf. V Reunión Nacional de Investigaciones de Cítricos y otros Frutales. Jagüey Grande, Matanzas, Cuba. Tomo II: 157-169.

Pérez, J.M.; N. Valdivia y A. De Bernard. 1980. Resultados de pruebas virales durante el periodo 76-79. Primer Forum de la Estación Nacional de Sanidad de Cítricos. Ciudad de La Habana, Cuba.

Pérez, J.M.; N. Matos; A. De Bernard; M. González; J. González e I. Peña.1981. Revisión de los estudios realizados con una enfermedad similar al crinkly leaf. Memorias I Congreso Nacional de Cítricos y otros Frutales. Palacio de las Convenciones. Ciudad de La Habana, Cuba. Tomo II: 265-281.

Pérez, J.M. y N. Matos. 1982. Características y métodos de detección de enfermedades virales en cítricos. Conferencia Curso de Citricultura. 16 p. IIFT. Cuba.

Pérez, J.M.; M. González; A. De Bernard; O. Fernández; Z. Acosta y M. Rodríguez. 1989. Situación del empleo de métodos de diagnóstico y de lucha en la prevención de agentes patógenos en los bancos de yemas de cítricos. Simposio XX Aniversario de la ENSAC. Ciudad de La Habana, Cuba.

Pérez, J. M.; V. Zamora; M. González y A. Ríos. 1995. Separación de viroides de la exocortis y caquexia mediante la técnica de microinjerto *in vitro* de ápices caulinares. Taller Internacional de Biotecnología Vegetal en Pastos, Cítricos y Caña de Azúcar, Indio Hatuey. Matanzas. Cuba.

Pérez, J. M.; I. Peña; K. Velázquez; L. Arias; M. Alonso; L. Batista y J. Cueto. 2002. Detección de agentes de tipo viral en un sistema de Producción de Material de Propagación Certificado de Cítricos. I Simposio Internacional Sobre Vigilancia Fitosanitaria y en Relación con la Protección al Entorno. Palacio de Convenciones de La Habana, Cuba.

Pérez, J.M.; I. Peña; L. Batista y E. López. 2007. Manual técnico de procedimientos para el diagnóstico biológico de enfermedades transmisibles por injerto en los cítricos. (En prensa).

UNECIT. MINAG. Cuba. 1987. Programa para la producción de material de propagación certificado de cítricos. Servicio de Inspección y Certificación de Semillas.

Zamora, V.; M. González y T. Rodríguez. 1995a. Posibilidades de utilización de diferentes patrones en la técnica de microinjerto *in vitro* en cítricos. (Datos no publicados).

Zamora, V.; J. M. Pérez; O. Mas; A. Ríos y T. Rodríguez. 1995b. Introducción de un grupo de variedades de cítricos a través del sistema de cuarentena. Taller Internacional de Biotecnología Vegetal en Pastos, Cítricos y Caña de Azúcar. Indio Hatuey. Matanzas. Cuba.

Zamora, V.; M. González; I. Peña; J. M. Pérez; T. Rodríguez; M. López y M. del C. Torres. 1997. Establecimiento del Banco de Germoplasma Protegido de especies y variedades de cítricos certificadas. Tercer Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal. Ciudad de La Habana. Cuba.

Zamora, V.; I. Peña y A. Ríos. 2005. El saneamiento de cultivares cítricos mediante la técnica de microinjerto *in vitro* de ápices caulinares. *CITRIFRUT* 22 (1, 2 y 3): 45-47.

Zamora, V.; I. Peña; M. González y J. González. 2006. Metodología para la técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro*. IIFT. Cuba.

Anexo 1

Accesiones de la Colección del Banco de Germoplasma Protegido.

Pomelos- Pummelos- Híbridos

1 Pomelo Ruby Red sel. V. Alonso
2 Pomelo Star Ruby
3 Pomelo Ruby selec. 1
4 Pomelo Ruby selec. 2
5 Pomelo Ruby selec. 4
6 Pomelo Ruby selec. 5
7 Pomelo Ruby selec. 17
8 Pomelo Ruby Mejorada
9 Pomelo Henderson IVIA 290-C-2
10 Pomelo Ray Ruby IVIA 291-C-1
11 Pomelo Rio Red IVIA 289-C-4
12 Pomelo Marsh Jibarito
13 Pomelo Frost Marsh
14 Pomelo Marsh JBC-430
15 Pomelo Duncan
16 Pomelo Thompson
17 Pomelo Thompson selec. 3
18 Pomelo Red Mexican
19 Pomelo Shambar
20 Pomelo Marsh selec. 6
21 Pomelo Marsh selec. 7
22 Pomelo Marsh selec. 8
23 Pomelo Marsh selec. 9
24 Pomelo Marsh selec. 10
25 Pomelo Marsh selec. 11
26 Pomelo Marsh selec. 12
27 Pomelo Marsh selec. 13
28 Pomelo Marsh selec. 14
29 Pomelo Marsh selec. 15
30 Pomelo Marsh selec. 16
31 Pomelo Marsh selec. 18
32 Pomelo Marsh selec. 19
33 Pomelo Marsh selec. 20
34 Pomelo Marsh selec. 21
35 Pomelo Marsh selec. 22
36 Toronja Ho Chi Minh
37 Híbrido Jagüey 95
38 Orangelo Chironja
39 Agrionja Gran Tierra 4
40 Naranja Boba
41 Pomelo Henderson IVIA 290-C-2 (Colección J-10)
42 Pomelo Ray Ruby IVIA 291-C-1 (Colección J-10)
43 Pomelo Rio Red IVIA 289-C-4 (Colección J-10)
44 Pomelo Ruby Red 43
45 Pomelo Ruby Red 19-5

Naranjas dulces

1 Naranja Valencia Criolla selec. 14
2 Naranja Valencia 121 selec. 18
3 Naranja Bayate Valencia selec.17
4 Naranja Valencia ENMC-27
5 Naranja Olinda Valencia
6 Naranja Campbell Valencia
7 Naranja Valencia de Contramaestre
8 Naranja Valencia sel. Cuba- 1
9 Naranja China 2
10 Naranja Hamlin
11 Naranja Victoria
12 Naranja Salustiana
13 Naranja Madame Vinous
14 Naranja Navel Temprana 886
15 Naranja Pineapple
16 Naranja Berna IVIA 43-1
17 Naranja Navelina IVIA 7-5
18 Naranja Valencia Temprana IVIA 25-1
19 Naranja Bonanza IVIA 67-4
20 Naranja Sucreña IVIA 32-7
21 Naranja Newhall IVIA 55-1
22 Naranja Salustiana IVIA 125-3
23 Naranja Navelate IVIA 2-7
24 Naranja Lane Late IVIA 198-C-1
25 Naranja Fisher IVIA 199-C-1
26 Naranja Fisher
27 Naranja San Miguel
28 Naranja Valencia Rio Farms
29 Naranja Navel Rocky Hill
30 Naranja Queen
31 Naranja Pope Summer
32 Naranja Hamlin (Sel. Regional)
33 Naranja Koethan Sweet
34 Naranja Temprana
35 Naranja Parson Brown
36 Naranja Jardines
37 Naranja Shamouti- 1
38 Naranja Lue Gim Gong
39 Naranja Washington Navel Foyos INIASEL- 45
40 Naranja Valencia Delta Seedless INIASEL - 363
41 Naranja Midknight IVIA - 368
42 Naranja Ambersweet IVIA- 430

Mandarinas-Híbridos

1 Mandarina Clementard IVIA 65-2
2 Mandarina Oroval IVIA 8-34
3 Mandarina Clementina
4 Mandarina Clemenules IVIA 22-19
5 Mandarina Parson's Special
6 Mandarina Dancy Mejorada
7 Mandarina Valles IVIA 17-3
8 Mandarina Satsuma Tropical
9 Mandarina Page IVIA 79-1
10 Mandarina Sunburst IVIA 200-C-1
11 Mandarina Lee
12 Tangelo Nova IVIA 74-7
13 Mandarina Fairchild IVIA 83-3
14 Mandarina Fairchild
15 Mandarina Maribel
16 Mandarina Fortune INIASEL-80
17 Mandarina Honey
18 Mandarina Kinnow
19 Mandarina Frua
20 Tangor Murcott
21 Tangelo Ugly
22 Tangelo Orlando
23 Tangelo Minneola
24 Tangor Dweet
25 Tangor Clemelin 11-20
26 Tangor Ellendale IVIA 194-1
27 Tangor Ortanique
28 Tangor Ortanique (selec. ENF)
29 Tangor Clemelina
30 Tangor Valentina
31 Mandarina Willowleaf

Limas

1 Lima mexicana
2 Lima Persa H-1
3 Lima Persa SRA-58
4 Lima Persa 98
5 Lima Rangpur
6 Lima mexicana sin espinas

Limones

1 Limón Fino IVIA 49-5
2 Limon Frost Eureka
3 Limon L-1
4 Limon Meyer
5 Limón Francés
6 Limón Ariel

Cidras

1 Cidra Arizona 861-S 1
2 Cidra Etrog 60-13

Patrones

1 Naranjo agrio Gou Tou
2 Sunki x Flying Dragon SS1-131-20
3 Citrumelo F 80-18
4 Citrumelo Swingle
5 Citrange C-35
6 Citrange Troyer
7 Citrange Carrizo
8 *Citrus macrophylla*
9 *Citrus volkameriana*
10 Mandarina Cleopatra
11 *Citrus amblycarpa*
12 Naranjo agrio de hoja fina
13 Cleopatra X *Poncirus* 1532
14 *Poncirus trifoliata* Rubidoux
15 Naranjo agrio 1
16 Flying dragon

Otros

1 *Citropsis gilletiana*